

- 理健康状况及其影响因素研究[J]. 公共卫生与预防医学, 2020, 31(2): 23-27.
- [19] 朱旭, 胡英哲, 王婷婷, 等. 新冠肺炎流行期大众心理症状调查[J]. 中国心理卫生杂志, 2020, 34(8): 703-709.
- [20] 郑晨, 吴淑琴, 王岑, 等. 新冠肺炎疫情期间湖北省居民心理健康状况调查[J]. 中国公共卫生, 2020, 36(5): 657-660.
- [21] 符永川, 王裕, 张莉靖, 等. 新冠肺炎疫情期间民众心理状况调查与分析[J]. 延安职业技术学院学报, 2020, 34(5): 18-22.
- (收稿日期: 2021-10-08, 修回日期: 2021-11-25)

引用本文: 籍文捷, 王志奎. 长链非编码RNA 6030408B16RIK表达下调对腹膜间皮细胞上皮-间质转化的影响[J]. 安徽医药, 2022, 26(6): 1118-1123. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2022.06.013.

◇临床医学◇



长链非编码RNA 6030408B16RIK表达下调对腹膜间皮细胞上皮-间质转化的影响

籍文捷, 王志奎

作者单位: 临沂市人民医院肾脏内科, 山东 临沂 276000

通信作者: 王志奎, 男, 副主任医师, 研究方向为尿毒症肾脏替代治疗, Email: 13854976746@163.com

基金项目: 山东省自然科学基金项目(ZR2019MH126); 山东省医药卫生科技发展计划项目(2018WS404)

摘要: **目的** 探讨长链非编码RNA(lncRNA)-6030408B16RIK在人腹膜间皮细胞上皮-间质转化(EMT)中的作用。**方法** 于2019年3月至2020年6月, 将36只大鼠以抽签法分为正常组6只、假手术组6只、尿毒症模型组24只, 采用5/6肾切除法建立大鼠尿毒症模型, 将尿毒症造模成功的大鼠再以抽签法分为: 尿毒症组(不进行腹膜透析)、腹膜透析组(腹膜透析4周)、小干扰RNA阴性对照(si-NC)组(腹膜透析4周+空质粒)、si-6030408B16RIK组(腹膜透析4周+si-6030408B16RIK), 每组6只。进行腹膜平衡试验检测大鼠超滤量和葡萄糖转运量, 处死大鼠并对大鼠壁层腹膜进行苏木精-伊红(HE)染色、Masson染色和免疫组织化学观察腹膜组织结构变化及胶原纤维化情况, 利用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)测定RNA的浓度和纯度, 利用蛋白质印迹法检测各组上皮钙黏素(E-cadherin)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、成纤维细胞特异性蛋白-1(FSP-1)和波形蛋白的蛋白表达水平。**结果** 与尿毒症组相比, 腹膜透析组、si-NC组和si-6030408B16RIK组大鼠的超滤量明显降低($P<0.05$), 而葡萄糖转运量明显升高($P<0.05$), 大鼠腹膜厚度和Ⅲ型胶原蛋白(Collagen Ⅲ)、CD31的阳性表达量均显著增加($P<0.05$), α -SMA、FSP-1和波形蛋白的表达均明显升高($P<0.05$); 相比于腹膜透析组, si-NC组大鼠的超滤量、葡萄糖转运量、腹膜厚度、Collagen Ⅲ、CD31及 α -SMA、FSP-1、波形蛋白的表达均差异无统计学意义($P>0.05$), 而相比于si-NC组, si-6030408B16RIK组大鼠的超滤量[(5.45±0.57)mL比(4.23±0.43)mL]显著增加($P<0.05$), 葡萄糖转运量[(16.12±1.65)mmol/kg比(19.54±1.97)mmol/kg]显著减少($P<0.05$), 大鼠腹膜厚度、Collagen Ⅲ、CD31的表达量均显著减小($P<0.05$), α -SMA、FSP-1和波形蛋白的表达[(0.65±0.06)、(1.29±0.13)、(1.39±0.14)比(1.24±0.12)、(1.72±0.19)、(1.99±0.21)]明显降低($P<0.05$), E-cadherin表达[(0.96±0.10)比(0.38±0.04)]明显回升($P<0.05$)。**结论** lncRNA 6030408B16RIK的表达下调可能改善了腹膜纤维化进程而延缓了超滤衰竭的发生。**关键词:** 上皮-间质转化; 尿毒症; 6030408B16RIK; 腹膜透析; 超滤衰竭; 胶原Ⅲ型; 大鼠, Sprague-Dawley

Effect of down-regulated expression of long noncoding RNA 6030408B16RIK on epithelial-mesenchymal transition in peritoneal mesenchymal cells

Ji Wenjie, Wang Zhikui

Author Affiliation: Department of Nephrology, Linyi People's Hospital, Linyi, Shandong 276000, China

Abstract: **Objective** To investigate the role of long noncoding RNA (lncRNA) 6030408B16RIK in epithelial-mesenchymal transition (EMT) of human peritoneal mesenchymal cells. **Methods** From March 2019 to June 2020, 36 rats were randomly assigned into normal group ($n=6$), sham operation group ($n=6$) and uremia group ($n=24$), and the uremia model was established by 5/6 nephrectomy method. The rats successfully modeled with uremia were then randomly subdivided into: Uremia group (no peritoneal dialysis), PD group (4-week peritoneal dialysis), small interfering RNA Negative Control (si-NC) group (4-week peritoneal dialysis+empty plasmid), si-6030408B16RIK group (4-week peritoneal dialysis+si-6030408B16RIK), 6 rats for each subgroup. Ultrafiltration volume and glucose transport volumes of rats were measured by peritoneal equilibration test. The rats were sacrificed and the parietal peritoneum was stained by HE staining, and the changes of peritoneum tissue structure and collagen fibrosis were observed by Masson staining and im-

munohistochemistry. The concentration and purity of RNA were determined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Western blotting was used to detect the protein expression levels of E-cadherin, α -smooth muscle actin (α -SMA), fibroblast specific protein-1 (FSP-1) and vimentin in each subgroup. **Results** Compared with Uremia group, the ultrafiltration volumes of PD group, si-NC group and si-6030408B16RIK group were significantly decreased ($P<0.05$), while glucose transport volumes were significantly increased ($P<0.05$). The peritoneal thickness and positive expressions of Collagen III and CD31 were significantly increased ($P<0.05$), and the expressions of α -SMA, FSP-1 and vimentin were significantly increased ($P<0.05$). Compared with PD group, there were no significant differences in ultrafiltration volume, glucose transfer volume, peritoneal thickness, Collagen III, CD31, α -SMA, FSP-1 and vimentin expressions in si-NC group. Compared with si-NC group, the ultrafiltration volume of si-6030408B16RIK group was significantly increased [(5.45 $\pm$ 0.57) mL vs. (4.23 $\pm$ 0.43) mL] ($P<0.05$), the glucose transfer volume [(16.12 $\pm$ 1.65) mmol/kg vs. (19.54 $\pm$ 1.97) mmol/kg] was significantly decreased ($P<0.05$), the peritoneum thickness, Collagen III and CD31 expressions were significantly decreased ($P<0.05$), the expressions of α -SMA, FSP-1 and vimentin were significantly decreased [(0.65 $\pm$ 0.06), (1.29 $\pm$ 0.13), (1.39 $\pm$ 0.14) vs. (1.24 $\pm$ 0.12), (1.72 $\pm$ 0.19), (1.99 $\pm$ 0.21)] ($P<0.05$), and the expression of E-cadherin increased significantly [(0.96 $\pm$ 0.10) vs. (0.38 $\pm$ 0.04)] ($P<0.05$). **Conclusion** The down-regulated expression of lncRNA 6030408B16RIK may improve the progression of peritoneal fibrosis and delay the occurrence of ultrafiltration failure.

Key words: Epithelial-mesenchymal transition; Uremia; 6030408B16RIK; Peritoneal dialysis; Ultrafiltration failure; Collagen type III; Rats, Sprague-Dawley

随着人口老龄化的增快,世界范围内慢性肾脏病(CKD)发病率也逐渐上升。腹膜透析是主要的肾脏透析治疗初始方法,其应用在世界不同地区和个别国家有着广泛的差异^[1]。与血液透析相比,长期存活率差异无统计学意义^[2]。在腹膜透析开始后不久,腹膜间皮细胞表现出上皮表型的进行性丧失,并通过上皮-间质转化(EMT)获得肌成纤维细胞样特征,发生转分化的腹膜间皮细胞具有更高的迁移和侵袭能力,能够侵入间皮下基质,从而促进腹膜纤维化和血管生成^[3-5]。EMT是指上皮细胞在特定的生理和病理情况下向间质细胞转化的现象和过程,上皮细胞表型的缺失及间质特性的获得是其主要特征^[6]。EMT不仅在多细胞生物胚胎发育、炎症控制、修复损伤的过程中发挥作用,而且在肝、肺、肾等器官纤维化、肿瘤侵袭与转移中也起着重要作用^[7]。长链非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA)是一类长度>200个核苷酸,不具备潜在编码蛋白质能力的基因转录产物^[8-9]。研究表明lncRNA可以在多种疾病如肿瘤、代谢综合征、心血管疾病及神经退行性疾病中表达异常,并且可以通过调控基因的表达从而影响疾病的病理生理过程^[10-11]。LIU等^[12]通过研究证实,lncRNA通过与微小RNA(miRNA)和mRNA之间形成复杂的调控网络从而参与腹膜纤维化,例如:lncRNA(ENSMUST00000053838, AK089579, uc008pwj.1, AK080622, AV310809)均与腹膜纤维化有关,但是,这些基因,尤其是lncRNA,在网络中的机制和功能仍不清楚。我们前期研究已经发现腹膜透析小鼠的腹膜组织中lncRNA 6030408B16RIK存在异常表达。本实验于2019年3月至2020年6月通过转染6030408B16RIK干扰小

RNA(siRNA)下调lncRNA 6030408B16RIK表达证明其对腹膜间皮细胞EMT的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 36只清洁级健康SD大鼠,周龄范围为6~8周,体质量(170.03 $\pm$ 52.00)g,由广东省医学实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(粤2013-0002),本研究符合一般动物实验伦理学原则。

1.2 实验材料与主要试剂 si-6030408B16RIK、NCs购自广州锐博公司, β 肌动蛋白(β -actin)抗体、上皮钙黏素(E-cadherin)抗体、抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体、成纤维细胞特异性蛋白-1(FSP-1)抗体、抗波形蛋白抗体、抗III型胶原蛋白(Collagen III)抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔抗体均购自英国Abcam公司。

1.3 方法

1.3.1 尿毒症大鼠模型的构建 36只清洁级健康SD大鼠,以抽签法分为三组:正常组6只、假手术组6只、尿毒症模型组24只,适应性喂养1周。采用5/6肾切除术建立尿毒症模型,6周后从所有大鼠的内眦静脉收集静脉血,测量血清肌酐和尿素氮以确定模型大鼠是否进入尿毒症阶段,其血清肌酐和尿素氮超过正常大鼠的2~3倍。将造模成功大鼠以抽签法分为:尿毒症组(不进行腹膜透析)、腹膜透析组(腹膜透析4周)、小干扰RNA阴性对照(si-NC)组(腹膜透析4周后行尾静脉注射6030408B16RIK抑制剂阴性对照)、si-6030408B16RIK组(腹膜透析后行尾静脉注射si-6030408B16RIK),每组6只。大鼠用3%戊巴比妥钠麻醉后仰卧位固定于手术台上,右侧腹中部置入腹膜透析管及皮下隧道,取5 mL生理盐水进行腹腔灌洗,确保管路通畅无液体渗漏后

固定腹膜透析管并封管,于每日上午8:00经腹膜透析管注入4.25%葡萄糖腹膜透析液(3 mL/100 g),为期4周。

1.3.2 腹膜平衡实验 大鼠腹膜透析结束后两天,将2 mL腹膜透析液注入腹腔,留取0.1 mL腹膜透析液检测0 h大鼠的超滤量和葡萄糖转运能力。2 h后打开腹腔,用注射器抽取腹腔内液体并精确地测量,用纱布吸干残留液体并称重。

1.3.3 大鼠腹膜组织病理 将大鼠安乐死,取出腹膜组织,进行常规苏木精-伊红(HE)染色、Masson染色观察腹膜组织结构变化及腹膜厚度等。

1.3.4 免疫组织化学 第一抗兔Collagen III抗体(ab7778, 1:100, Abcam Inc., Cambridge, UK)和生物素标记的山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G二级抗体(ab150077, 1:100, Abcam Inc., Cambridge, UK)进行免疫组织化学制片,在光学显微镜下观察样品。

1.3.5 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR) 利用Trizol试剂提取大鼠腹膜组织总RNA, Nano Drop2000测定RNA的浓度和纯度。根据Genbank数据库、miRbase数据库中公开发表的基因序列,分别采用Primer5.0和miRprimer2引物设计软件设计PCR反应引物,见表1,引物由上海吉玛公司合成。使用ABI PRISM 7500实时PCR系统(美国ABI公司)进行PCR反应,以 β -actin为内参对照,按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行半定量分析。

1.3.6 蛋白质印迹法 提取大鼠腹膜组织的总蛋白,按照BCA试剂盒说明书测定蛋白浓度,按照40微克/孔上样电泳分离后转膜,分别加入一抗 α -SMA(Abcam, ab32575, 兔抗, 1:500)、FSP-1(Abcam, ab197896, 兔抗, 1:500)、E-cadherin(Abcam, ab181296, 兔抗, 1:500)、波形蛋白(Abcam, ab137321, 兔抗, 1:500)、 β -actin(Abcam, ab8227, 兔抗, 1:1000),4℃孵育过夜,加入相应山羊抗兔二抗IgG抗体(ab6721, 1:500, Abcam, Cambridge, UK),室温孵育1 h。化学发光试剂显影, β -actin作为内参,目的条带采用Image J软件进行灰度值分析。

1.4 统计学方法 使用SPSS 21.0软件统计。计量

资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用两独立样本 t 检验,多组之间的比较采用单因素方差分析,多组间的两两比较采用LSD法。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 尿毒症模型鉴定 测量大鼠内眦静脉血中的血肌酐和尿素氮,以确定是否成功建立了尿毒症大鼠模型。结果表明,假手术大鼠的血肌酐和尿素氮与正常大鼠差异无统计学意义($P > 0.05$)。尿毒症模型组大鼠血液中的肌酐含量为正常大鼠的2.981倍,尿素氮值为2.782倍。因此,可以确定成功建立了尿毒症大鼠模型。见表2。

表2 大鼠造模后肾功能情况比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	血肌酐/(μ mol/L)	尿素氮/(mmol/L)
正常组	6	45.36 $\pm$ 4.63	3.82 $\pm$ 0.41
假手术组	6	50.31 $\pm$ 4.87 ^①	4.05 $\pm$ 0.44 ^①
尿毒症模型组	6	135.24 $\pm$ 13.66	10.61 $\pm$ 1.11
F值		198.32	168.66
P值		<0.001	<0.001

注:①与尿毒症模型组比较, $P < 0.001$ 。

2.2 大鼠腹膜组织中6030408B16RIK的表达 尿毒症组、腹膜透析组、si-NC组和si-6030408B16RIK组大鼠腹膜组织中6030408B16RIK的表达分别为(1.01 $\pm$ 0.12)、(3.26 $\pm$ 0.34)、(3.01 $\pm$ 0.32)和(2.16 $\pm$ 0.21), $F=88.17$, $P < 0.001$ 。与尿毒症组相比,腹膜透析组、si-NC组和si-6030408B16RIK组大鼠腹膜组织中6030408B16RIK的表达均明显升高($P < 0.001$);相比于腹膜透析组,si-NC组大鼠腹膜组织中6030408B16RIK的表达差异无统计学意义($P > 0.05$);相比于si-NC组,si-6030408B16RIK组中6030408B16RIK的表达明显降低($P < 0.001$)。

2.3 大鼠腹膜形态观察 通过HE染色、Masson染色和免疫组织化学观察腹膜组织结构变化和胶原纤维化。图1结果表明,与尿毒症组相比,腹膜透析组、si-NC组和si-6030408B16RIK组细胞变为圆柱形,间皮细胞有脱落,间皮基质增加,可见大量纤维样细胞,巨噬细胞浸润,且有大量胶原沉积,大鼠腹

表1 RT-PCR引物序列

名称	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
6030408B16RIK	CGCCATCCAGAGTTCATTTC	AGTCCATCACCACAAGCACA
α -SMA	TGCTGACAGAGGCACCACTGAA	CAGTTGTACGTCCAGAGGCATA
E-cadherin	GTATCGTCCCCGTCCAGC	GGTTGCCCCATTCCGTTCA
波形蛋白	ATGAAAGTGTGGCTGCCAAGAAC	GTGACTGCACCTGTCTCCGGTA
FSP-1	GTCCACCTTCCACAAAATACTCA	GCACTATGCTCACAGCCAAC
β -actin	GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA	GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG

注: α -SMA为 α -平滑肌肌动蛋白,E-cadherin为上皮钙黏素,FSP-1为成纤维细胞特异性蛋白-1, β -actin为 β 肌动蛋白。

膜厚度显著增加,大鼠间皮下纤维也明显增厚。通过免疫组织化学检测腹膜血管特异性蛋白 CD31 和 Collagen Ⅲ,统计结果表明,与尿毒症组相比,腹膜透析组、si-NC 组和 si-6030408B16RIK 组大鼠腹膜厚度和 Collagen Ⅲ、CD31 的阳性表达量均显著增加($P<0.05$);相比于腹膜透析组,si-NC 组大鼠腹膜厚度和 Collagen Ⅲ、CD31 的表达量均差异无统计学意义($P>0.05$);而相比于 si-NC 组,si-6030408B16RIK 组大鼠腹膜厚度、Collagen Ⅲ、CD31 的表达量均显著减小($P<0.05$)。见表 3。

2.4 大鼠腹膜超滤量 腹膜平衡实验结果表明,腹膜透析组、si-NC 组和 si-6030408B16RIK 组大鼠的超滤量明显小于尿毒症组($P<0.05$),而葡萄糖转运量则明显大于尿毒症组($P<0.05$);相比于腹膜透析组,si-NC 组大鼠的超滤量和葡萄糖转运量均差异无统计学意义($P>0.05$),而相比于 si-NC 组,si-6030408B16RIK 组大鼠的超滤量显著增加($P<0.05$),葡萄糖转运量显著减少($P<0.05$)。见表 4。

2.5 大鼠腹膜组织中 α -SMA、FSP-1、波形蛋白、E-cadherin 及 6030408B16RIK 的表达测定 相比于尿毒症组,腹膜透析组和 si-NC 组中 6030408B16RIK、 α -SMA、FSP-1 和波形蛋白的表达显著上调($P<0.05$),而 E-cadherin 表达下降($P<0.05$),当对 6030408B16RIK 进行干扰处理后,6030408B16RIK、 α -SMA、FSP-1 和波形蛋白的表达显著降低($P<$

表 4 大鼠腹膜功能比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	超滤量/mL	MTG/(mmol/kg)
尿毒症组	6	8.25±0.86	12.01±1.24
腹膜透析组	6	4.13±0.42 ^①	19.11±1.99 ^①
si-NC 组	6	4.23±0.43 ^①	19.54±1.97 ^①
si-6030408B16RIK 组	6	5.45±0.57 ^{①②}	16.12±1.65 ^{①②}
F 值		61.96	23.87
P 值		<0.001	<0.001

注:MTG 为葡萄糖转运量。

①与尿毒症组比较, $P<0.001$ 。②与 si-NC 组比较, $P<0.001$ 。

0.05),同时 E-cadherin 表达回升($P<0.05$)。见表 5、6。

3 讨论

在过去的几十年中,腹膜透析已经成为替代血液透析治疗 ESRD 的公认方式,腹膜透析中最重要的挑战之一便是如何长期保存腹膜的完整性。

本课题通过采取大鼠肾脏 5/6 切除法来构建尿毒症模型,检测大鼠血液中肌酐以及尿素氮的水平评估是否造模成功,然后通过置入腹膜透析管连续四周每天向大鼠腹腔内灌注 4.25% 双联腹膜透析液,检测大鼠超滤量以及 MTG 来评估大鼠的腹膜功能。通过本实验方法所构建的尿毒症模型贴近尿毒症腹膜透析相关腹膜纤维化的临床病理生理过程,并且操作过程相对简单,成本相对来说比较低且成功率较高,对后续观察大鼠的腹膜组织结构及功能的变化等方面提供了良好的条件。

表 3 大鼠腹膜形态比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	腹膜厚度/ μ m	Collagen Ⅲ/%	CD31/%
尿毒症组	6	17.32±1.78	21.54±2.64	16.04±1.28
腹膜透析组	6	42.18±4.32 ^①	37.96±4.12 ^①	47.66±5.49 ^①
si-NC 组	6	38.57±3.95 ^①	41.56±5.42 ^①	50.04±6.07 ^①
si-6030408B16RIK 组	6	28.11±2.96 ^{①②}	31.46±3.56 ^{①②}	15.87±1.92 ^{①②}
F 值		65.27	28.09	120.08
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:Collagen Ⅲ 为Ⅲ型胶原蛋白。

①与尿毒症组比较, $P<0.001$ 。②与 si-NC 组比较, $P<0.001$ 。

表 5 大鼠腹膜组织中 6030408B16RIK、 α -SMA、FSP-1、波形蛋白、E-cadherin 的 mRNA 相对表达量比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	6030408B16RIK	α -SMA	FSP-1	波形蛋白	E-cadherin
尿毒症组	6	1.01±0.12	1.00±0.11	1.00±0.23	1.00±0.10	1.02±0.10
腹膜透析组	6	2.44±0.25 ^①	1.71±0.18 ^①	1.80±0.14 ^①	1.88±0.19 ^①	0.40±0.05 ^①
si-NC 组	6	2.22±0.21 ^①	1.62±0.17 ^①	1.75±0.12 ^①	1.95±0.20 ^①	0.35±0.04 ^①
si-6030408B16RIK 组	6	1.46±0.14 ^②	1.12±0.13 ^②	1.21±0.31 ^②	1.33±0.14 ^②	0.89±0.09 ^②
F 值		75.12	34.03	37.04	48.11	111.13
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: α -SMA 为 α -平滑肌肌动蛋白,FSP-1 为成纤维细胞特异性蛋白-1,E-cadherin 为上皮钙黏素。

①与尿毒症组比较, $P<0.001$ 。②与 si-NC 组比较, $P<0.001$ 。

表6 大鼠腹膜组织中 α -SMA、FSP-1、波形蛋白、E-cadherin的蛋白相对表达量比较 $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	α -SMA	FSP-1	波形蛋白	E-cadherin
尿毒症组	6	0.71 $\pm$ 0.08	1.02 $\pm$ 0.13	1.09 $\pm$ 0.11	1.01 $\pm$ 0.11
腹膜透析组	6	1.31 $\pm$ 0.13 ^①	1.82 $\pm$ 0.22 ^①	1.85 $\pm$ 0.19 ^①	0.46 $\pm$ 0.05 ^①
si-NC组	6	1.24 $\pm$ 0.12 ^①	1.72 $\pm$ 0.19 ^①	1.99 $\pm$ 0.21 ^①	0.38 $\pm$ 0.04 ^①
si-6030408B16RIK组	6	0.65 $\pm$ 0.06 ^②	1.29 $\pm$ 0.13 ^②	1.39 $\pm$ 0.14 ^②	0.96 $\pm$ 0.10 ^②
F值		66.82	29.56	37.14	100.03
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: α -SMA为 α -平滑肌肌动蛋白,FSP-1为成纤维细胞特异性蛋白-1,E-cadherin为上皮钙黏素。

①与尿毒症组比较, $P<0.001$ 。②与si-NC组比较, $P<0.001$ 。

长期暴露于生物不相容性腹膜透析液、腹膜透析过程中腹膜炎的反复发生和其他一些理化因素,或多或少会造成腹膜的结构与功能发生不同程度的改变,最终的结果会造成EMT,导致腹膜透析病人腹膜发生纤维化,从而发展为超滤衰竭^[13-15]。在同等葡萄糖负荷的情况下,应用新型腹膜透析液(中性pH、缓冲碱为碳酸氢盐、低葡萄糖降解产物)相较于应用生物不相容性腹膜透析液的病人其腹膜纤维化的程度更轻^[16]。因为常规的腹膜透析液由于酸性pH、高浓度的葡萄糖、葡萄糖降解产物、糖基化终产物和乳酸盐这些非生理成分可以造成腹膜形态学的改变,抑制了腹膜间皮细胞的增殖活性和EMT的发生,最终引起腹膜病理改变,其表现形式主要为腹膜纤维化^[16-19]。

反复发生的腹膜炎以及新生血管的生成是腹膜纤维化发病的主要机制,腹膜纤维化是一个进行性且不可逆的过程,与超滤功能障碍有关,细胞外基质的过度沉积会造成纤维化的发生,其发生在许多脏器中,并最终会导致脏器衰竭^[20]。迄今为止,腹膜纤维化作为长期进行腹膜透析病人的主要并发症之一,常常会给病人带来高昂的医疗费用,因此增加了他们的经济负担,尽管目前进行了大量的研究和临床试验,但仍没有有效的治疗方法或者可以改变其病程进展的药物^[21]。因此探究腹膜纤维化的病理生理机制对改善腹膜透析病人超滤衰竭的发生变得十分重要。

通过本研究可以观察到,与Uremic组大鼠相比,腹膜透析组大鼠可观察到腹膜间皮细胞变为圆柱形、脱落,间皮下基质增加,可以看到大量的成纤维样细胞和大量的巨噬细胞浸润其中,而且观察到有大量胶原沉积,大鼠的间皮下纤维以及腹膜厚度也表现出显著增加,Collagen III、CD31的阳性表达量均显著增加,大鼠腹膜超滤量以及MTG均表现出明显下降。因此,长期进行腹膜透析与腹膜的结构性改变和功能性改变有关,从而导致腹膜透析治疗的中断。

已知EMT是一个极其复杂但是早期可以逆转的过程,其特征是顶-基底外侧极性的丧失和细胞间连接的破坏,以及迁移、侵袭和纤维化的特征增加。它还伴有蛋白质表达的改变,包括上皮蛋白质的丢失,以及新的间充质标志物的获得,包括FSP-1、波形蛋白以及 α -SMA^[22-23]。从本研究可以发现,与Uremic组大鼠相比,腹膜透析组大鼠 α -SMA、FSP-1和波形蛋白的表达水平显著上调,而E-cadherin表达水平下降,因此可以通过相关蛋白分子的表达水平反映EMT的发生及腹膜纤维化的严重程度。

先前的研究非常重视lncRNA的功能,因lncRNA具有广泛的生物学功能,结合其受限制的细胞类型特异性表达,使lncRNA成为有吸引力的治疗靶点,许多lncRNA已经被证明参与了疾病的发展,这突出了lncRNA作为许多疾病的新型诊断以及预后判断的重要性^[24]。越来越多的研究发现可以证明,在多种组织中表现出异常表达的lncRNA能够广泛参与各类疾病的病理机制。一些lncRNA被证明与纤维化有关,lncRNA的降低和过量表达减轻或增强了体内纤维化程度,表明lncRNA可以作为一种新的靶点去参与纤维化的治疗,具有重要的意义^[25]。

本课题采取构建尿毒症大鼠模型并进行腹膜透析形成腹膜纤维化,随后通过转染siRNA来下调lncRNA 6030408B16RIK表达水平,目的是以此来观察lncRNA 6030408B16RIK表达水平的变化对腹膜间皮细胞EMT的作用,从而间接反映对腹膜纤维化以及超滤衰竭的影响。和Uremic组进行比较,si-NC组、腹膜透析组以及si-6030408B16RIK组大鼠的腹膜组织中6030408B16RIK的表达均明显上升,si-NC组以及腹膜透析组的大鼠腹膜组织中6030408B16RIK的表达差异无统计学意义;和si-NC组进行比较,si-6030408B16RIK组中6030408B16RIK的表达明显降低。上述结果证实大鼠体内的小干扰RNA与空质粒均转染成功,分组成立可进行下一步观察。

前期研究已经证实 lncRNA 6030408B16RIK 表达水平上调可以促进 EMT 发生。本研究结果证明,与 si-NC 组相比,si-6030408B16RIK 组大鼠腹膜厚度及 Collagen III、CD31 的表达量均显著减小,超滤量增加、葡萄糖转运量减少, α -SMA、FSP-1 和波形蛋白表达减少,E-cadherin 表达回升,证实 6030408B16RIK 表达下调可以延缓 EMT 过程,从而改善腹膜透析大鼠的腹膜纤维化程度,并可以在防治腹膜透析相关性腹膜纤维化的过程中提供新的理论依据及支撑点,但是目前关于 lncRNA 6030408B16RIK 改善 EMT 的相关分子机制尚不清楚,需予以进一步研究。

(本文图 1 见插图 6-4)

参考文献

- [1] GRASSMANN A, GIOBERGES S, MOELLER S, et al. ESRD patients in 2004: global overview of patient numbers, treatment modalities and associated trends [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2005, 20(12): 2587-2593.
- [2] MEHROTRA R, CHIU YW, KALANTAR-ZADEH K, et al. Similar outcomes with hemodialysis and peritoneal dialysis in patients with end-stage renal disease [J]. *Arch Intern Med*, 2011, 171(2): 110-118.
- [3] YÁÑEZ-MÓ M, LARA-PEZZI E, SELGAS R, et al. Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(5): 403-413.
- [4] BARONI G, SCHUINSKI A, DE MORAES TP, et al. Inflammation and the peritoneal membrane: causes and impact on structure and function during peritoneal dialysis [J]. *Mediators Inflamm*, 2012, 2012: 912595. DOI: 10.1155/2012/912595.
- [5] AROEIRA LS, AGUILERA A, SÁNCHEZ-TOMERO JA, et al. Epithelial to mesenchymal transition and peritoneal membrane failure in peritoneal dialysis patients: pathologic significance and potential therapeutic interventions [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(7): 2004-2013.
- [6] KALLURI R, WEINBERG RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(6): 1420-1428.
- [7] MASOLA V, ZAZA G, ONISTO M, et al. Impact of heparanase on renal fibrosis [J]. *J Transl Med*, 2015, 13(1): 181.
- [8] SPIZZO R, ALMEIDA MI, COLOMBATTI A. Long non-coding RNAs and cancer: a new frontier of translational research? [J]. *Oncogene*, 2012, 31(43): 4577-4587.
- [9] KANDURI C. Long noncoding RNA and epigenomics [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2011, 722: 174-195.
- [10] CHOUDHARI R, SEDANO MJ, HARRISON AL, et al. Long non-coding RNAs in cancer: from discovery to therapeutic targets [J]. *Adv Clin Chem*, 2020, 95: 105-147.
- [11] SUN M, KRAUS WL. From discovery to function: the expanding roles of long noncoding RNAs in physiology and disease [J]. *Endocr Rev*, 2015, 36(1): 25-64.
- [12] LIU Y, GUO R, HAO G, et al. The expression profiling and ontology analysis of noncoding RNAs in peritoneal fibrosis induced by peritoneal dialysis fluid [J]. *Gene*, 2015, 564(2): 210-219.
- [13] ZHANG Z, JIANG N, NI Z. Strategies for preventing peritoneal fibrosis in peritoneal dialysis patients: new insights based on peritoneal inflammation and angiogenesis [J]. *Front Med*, 2017, 11(3): 349-358.
- [14] KANEKO K, HAMADA C, TOMINO Y. Peritoneal fibrosis intervention [J]. *Perit Dial Int*, 2007, 27 Suppl 2: S82-S86.
- [15] SCHILTE MN, CELIE JW, WEE PM, et al. Factors contributing to peritoneal tissue remodeling in peritoneal dialysis [J]. *Perit Dial Int*, 2009, 29(6): 605-617.
- [16] VILA CM, KEUNING ED, TALHOUT W, et al. Differences in peritoneal response after exposure to low-GDP bicarbonate/lactate-buffered dialysis solution compared to conventional dialysis solution in a uremic mouse model [J]. *Int Urol Nephrol*, 2018, 50(6): 1151-1161.
- [17] HIGUCHI C, NISHIMURA H, SANAKA T. Biocompatibility of peritoneal dialysis fluid and influence of compositions on peritoneal fibrosis [J]. *Ther Apher Dial*, 2006, 10(4): 372-379.
- [18] PLUM J, RAZEGLI P, LORDNEJAD RM, et al. Peritoneal dialysis fluids with a physiologic pH based on either lactate or bicarbonate buffer-effects on human mesothelial cells [J]. *Am J Kidney Dis*, 2001, 38(4): 867-875.
- [19] MORTIER S, FAICT D, SCHALKWIJK CG, et al. Long-term exposure to new peritoneal dialysis solutions: effects on the peritoneal membrane [J]. *Kidney Int*, 2004, 66(3): 1257-1265.
- [20] LI Z, YAN H, YUAN J, et al. Pharmacological inhibition of heparin-binding EGF-like growth factor promotes peritoneal angiogenesis in a peritoneal dialysis rat model [J]. *Clin Exp Nephrol*, 2018, 22(2): 257-265.
- [21] ZHANG F, LIU H, LIU F, et al. New insights into the pathogenesis and treatment of peritoneal fibrosis: a potential role of Wnt/ β -catenin induced epithelial to mesenchymal transition and stem cells for therapy [J]. *Med Hypotheses*, 2013, 81(1): 97-100.
- [22] LIU Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(1): 1-12.
- [23] JIMENEZ-HEFFERNAN JA, AGUILERA A, AROEIRA LS, et al. Immunohistochemical characterization of fibroblast subpopulations in normal peritoneal tissue and in peritoneal dialysis-induced fibrosis [J]. *Virchows Arch*, 2004, 444(3): 247-256.
- [24] JIANG X, LEI R, NING Q. Circulating long noncoding RNAs as novel biomarkers of human diseases [J]. *Biomark Med*, 2016, 10(7): 757-769.
- [25] JIANG X, ZHANG F. Long noncoding RNA: a new contributor and potential therapeutic target in fibrosis [J]. *Epigenomics*, 2017, 9(9): 1233-1241.

(收稿日期: 2020-08-05, 修回日期: 2020-09-22)